

コムギ赤さび病菌の冬孢子形成誘導物質の研究

著者	細江 智夫
雑誌名	星薬科大学紀要
号	44
ページ	17-23
発行年	2002
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000108/

コムギ赤さび病菌の冬孢子形成誘導物質の研究

細 江 智 夫

星薬科大学 薬化学教室

A substance inducing teliospore production in wheat leaf rust,
Puccinia recondita f. sp. *tritici*

Tomoo Hosoe

Department of Organic Chemistry, Hoshi University

はじめに

担子菌門さび菌目に属するさび菌類は、約 120 属 6000 種が知られており、現在報告されている担子菌類の約 30%、全菌類の約 9% を占める大きなグループである。

さび菌類は通常、夏孢子、冬孢子、担子孢子、精子、さび孢子の 5 つの異なる孢子世代を順次形成して行く複雑な生活環を持ち、その多くは夏孢子・冬孢子・担子孢子を形成する時の宿主植物とさび孢子・担子孢子を形成する時の宿主植物が異なる異種寄生性の菌である(図 1)。さび菌類は、主に夏孢子のときに反復感染し、多岐にわたる宿主植物に対してしばしば激しい病害を引き起こす宿主特異性の高い植物病原菌として有名である。今回、研究材料としたコムギ赤さび病菌を例にとると、日本での被害は少ないが、春蒔きコムギ栽培を主体とする欧米各国やオーストラリアにおいて、たびたび激しい被害が記録されており、深刻な問題となっている。一般に、宿主植物が休眠期(多年性植物では落葉時、一年性植物では枯草期)に近づくとき、さび菌類は休眠期である冬孢子を形成するため、その病害の拡大も終焉する。宿主植物上で早期に冬孢子を形成させる化学物質を単離・構造決定できれば、本菌による病害の防除に有効な手段となる可能性が高まるとともにさび菌類の生活環の一部を解明するという点で生物学的あるいは化学生態学的にも意義あるものと考えられる。さび菌類については、これまでに多くの分類研究や生活環に関する研究がなされている。さび病菌の冬孢子形成誘導因子に関しては、光・気温・湿度等の環境条件や宿主植物の生理状態、宿主植物の抵抗性などの報告があるが、さび病菌の各孢子世代における形態変化に関与する化学物質については未だ研究報告の例がない¹⁻¹³⁾(表 1)。

その理由として、(1) これまでに各孢子世代間の形態変化に関する評価方法がなかったこと、(2) 絶対的寄生菌であるさび菌類は、人工培養方法が確立していないた

め、菌の確保は野外採集に頼らざるをえなく、大量確保が困難であること、(3) 「微生物ホルモン」と呼ばれるような形態変化に関与する化学物質の単離は、極微量物質の単離になることが予想されたことなどが挙げられる。しかし、近年筑波大学山岡らにより、コムギ子葉を用いたコムギ赤さび病菌 *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* の冬孢子形成誘導活性試験方法が確立されたことや各種分離・分析機器の発展や方法論の開発等によりナノモル程度での構造決定が可能になりつつあることから、さび菌類の形態変化に関与する化学物質の単離および構造解析は可能であると判断し、本研究テーマに着手した。本報では、コムギ赤さび病菌の冬孢子形成誘導物質について、これまでに得られた知見を報告する。

1. 冬孢子形成誘導物質の生物検定法¹⁴⁾

本研究における冬孢子形成誘導物質の分離精製の評価は、ここに記した検定方法に従って行なわれた。

1-1 使用菌株

検定には、コムギ赤さび病菌 *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* race1A を用いた。この菌株は、筑波大学植物病理および菌学研究室で、夏孢子世代で継代維持してきたものである。

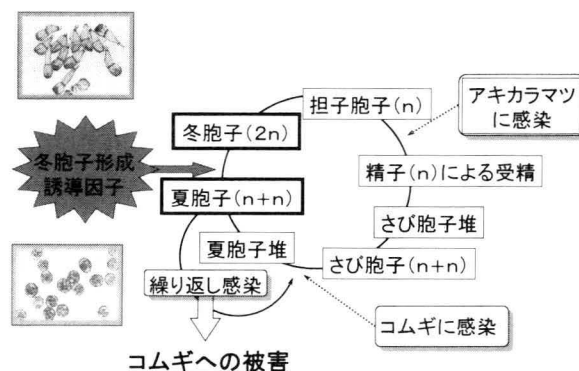
図 1 コムギ赤さび病菌 (*P. recondita*) の生活環

表1 これまでのさび菌類の冬孢子形成誘導因子についての報告

1891	Magnus	さび菌類の冬孢子形成について宿主植物の生育状態の関与を初めて報告 ¹⁾ .
1915	Gassner	宿主植物の生育段階や生理的老化の関与を報告 ²⁾ .
1918	Parker	エンバク冠さび病菌の冬孢子形成について、宿主植物の抵抗性の関与を報告 ³⁾ .
1928	Water	宿主植物に悪条件（暗黒、低温、乾燥、貧栄養）を与えることで、コムギ赤さび病菌以外の9種のさび菌の冬孢子形成誘導に成功したことから、宿主植物の代謝が外的要因（光、気温、湿度等）により影響を受け、光合成活性が低下することが冬孢子形成を促進すると報告 ⁴⁾ .
1930	Peturson	エンバク冠さび病菌について、気温の上昇が冬孢子形成を早めると報告 ⁵⁻⁷⁾ . また、エンバク冠さび病菌について、菌の病原力や宿主植物の抵抗性・生育段階には関係なく、特定の品種と菌との組み合わせにより、冬孢子形成時期が決定すると報告 ⁷⁾ .
1954	Simons	
1961	Zimmer	
1965	高橋	コムギ赤さび病菌について、菌の生態型あるいは菌株とコムギの品種の組み合わせにより、幼苗上の冬孢子形成速度や程度が異なることを報告 ^{8,9)} .
1967	Jackson	
1966	Mirocha	さび菌の感染強度が冬孢子形成の早さに影響すると報告 ¹⁰⁾ .
1981	Yeh	夜間低温条件下で生育させることで、マメ科植物上のさび菌 <i>Phakospora pachyrhizi</i> の冬孢子形成誘導したことを報告 ¹¹⁾ .
1994	Volker	<i>Uromyces appendiculatus</i> に感染したインゲンを、2日間暗黒条件下におくことで、冬孢子形成誘導できたことから、冬孢子形成には宿主植物の光合成産物の減少が関係していると報告 ¹²⁾ .
1995	Wagner	夏孢子から冬孢子が形成されるまでの各段階について、宿主植物中の炭水化物量やその分解酵素活性を調べ、グルコースの減少が冬孢子形成を誘導すると報告 ¹³⁾ .

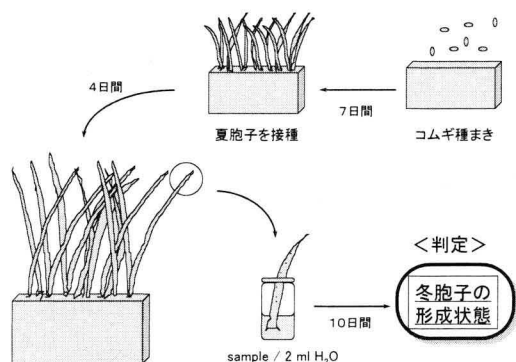


図2 冬孢子形成誘導活性物質の生物検定法

1-2 試験および評価方法

角型プラスチックポット (150×50×100 mm) に、赤玉土：腐葉土を3：1の割合で混合し、コムギ種子（農林16号）を播種して、種子が隠れる程度に覆土した。これを22℃、12時間照明 (15,000 lx)・12時間暗黒条件下の植物インキュベータに置いた。7日後、コムギの子葉が7～8 cmに伸長したとき、コムギ赤さび病菌の夏孢子を接種した。これを22℃、暗黒条件下温室に一昼夜置き、再びインキュベータに戻した。

菌を接種してから4日後、夏孢子を接種したコムギ子葉の上部4～5 cmを切り取り、蒸留水で2 mlに希釈した検体を入れたガラス容器に差し込んだ。これを12時間照明 (15,000 lx)・12時間暗黒条件の植物インキュベータに置いた。検定中、コムギに吸収されて各ガラス容器内の液が減少するため、コムギの枯れを防ぐために適時、蒸留水を加えた。10日後、コムギ子葉上のコムギ赤さび病菌の冬孢子形成の状況を観察し、冬孢子形成誘

導活性について次の4段階に評価判定した（図2）。

- +++（強：冬孢子堆が夏孢子堆のグリーンアイランド周辺部を完全に囲むように形成される。図3参照）
- ++（中：冬孢子堆が夏孢子堆のグリーンアイランド周辺部を断続的に囲むように形成される。）
- ＋（弱：冬孢子堆が散在的に形成される。）
- －（無：冬孢子堆がまったく形成されないか、若干形成される。）

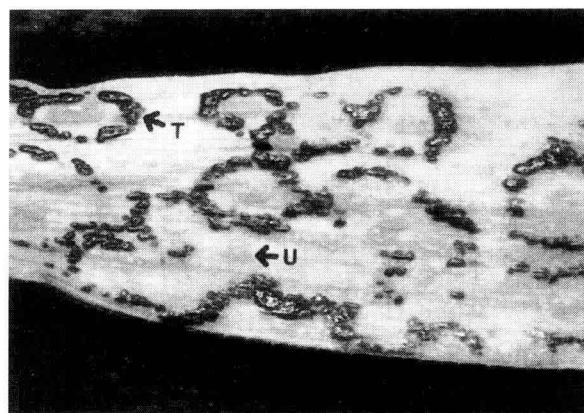
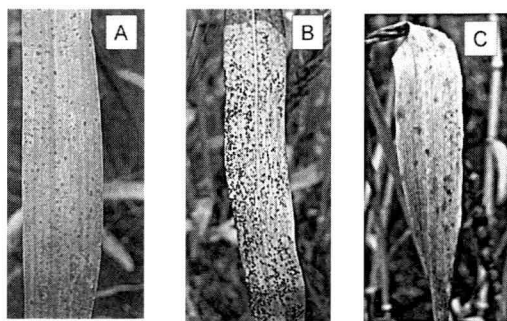


図3 コムギ子葉上におけるコムギ赤さび病菌の冬孢子堆の形成。
グリーンアイランド周辺部を完全に囲むように形成している。（図は、強：+++として評価）
T, teria（冬孢子堆）、U, uredinia（夏孢子堆）。

2. 冬孢子形成誘導物質の生成挙動についての検討¹⁴⁾

自然状態において、コムギ赤さび病菌の冬孢子が形成



試料A:開花期(多くの夏胞子堆が形成している状態: 5/16 採集)
試料B:完熟期(冬胞子堆が多数形成している状態: 5/30 採集)
試料C:枯熟期(葉がかなり枯れた状態: 6/10 採集)

図4 各生育段階の罹病コムギ葉

し始める時期は、通常宿主植物であるコムギが枯れ始め黄褐色がかかる時期に限られている。この現象から、冬胞子形成誘導物質の生成は時期的要因が影響していると推測できる。そこで、冬胞子形成誘導物質の分離に適した抽出時期、すなわちコムギ葉中の冬胞子形成誘導物質量がもっとも多くなる時期を明らかにする実験を行なった。

また、コムギ赤さび病の感染と冬胞子形成誘導物質の生成との関連性を明らかにするために、感染コムギ葉および未感染コムギ葉の各抽出エキスについて、冬胞子形成誘導活性試験を行なった。

2-1 原料採集および抽出方法

コムギ赤さび病菌に感染したコムギ(農林16号)の葉および茎部は、国立農林水産省農業研究センター(茨城県つくば市)の実験圃場から採集した。

冬胞子形成誘導物質の生成時期を調査するために、1995年にコムギの3つの異なる生育段階での試料採集を行なった。多くの夏胞子堆を形成している開花期(5月16日)に採集したコムギ葉を試料A、冬胞子堆形成が多数認められた収穫直前の完熟期(5月30日)に採集したコムギ葉を試料B、さらに葉がかなり枯れてしまった枯熟期(6月10日)に採集したコムギ葉を試料Cとした(図4)。

また、筑波大学実験農場(茨城県つくば市)で栽培された収穫期直前の完熟期にあるさび菌未感染コムギ葉(農林16号)を採集し、試料Dとした。

それぞれのコムギ葉は、室内で自然乾燥した後、ハサミで小片に刻み、各コムギ葉2gについて、ジクロロメタン、アセトンおよびメタノールで各24時間ずつ順次抽出し、減圧濃縮した。得られた抽出物は、メタノール0.5mlに溶解した後、蒸留水で10, 20および40倍に希釈し、生物検定を行なった。

2-2 罹病コムギの生育段階と冬胞子形成誘導物質の生成との関係

罹病コムギ葉のジクロロメタン、アセトンおよびメタ

表2 罹病コムギの各生育時期における葉メタノール抽出エキスの冬胞子形成誘導活性

	抽出エキスの希釈比率		
	×10	×20	×40
試料A	+, -	-, -	+, -
試料B	+++, +	+++, +++	+, -
試料C	+, -	-, -	-, -

※試料D(未感染コムギ葉抽出エキス)には、活性は認められなかった。

ノール抽出エキスの中で冬胞子形成誘導活性を示したのは、メタノール抽出エキスのみであった。

コムギの各生育時期の葉抽出エキス中で、もっとも強い冬胞子形成誘導活性を示したのは、収穫直前の完熟期に採集した冬胞子堆を多数形成した感染コムギ葉(試料B)であり、多くの夏胞子堆を形成し、冬胞子堆の形成が認められない開花期のコムギ葉(試料A)や枯熟期の感染コムギ葉(試料C)は、弱い活性しか示さなかった(表2)。

2-3 コムギ赤さび病の感染と冬胞子形成誘導物質の生成の関係

収穫期直前のコムギ赤さび病菌未感染コムギ葉(試料D)のメタノール抽出エキスは、同じ生育時期に採集した冬胞子堆が多数形成した感染コムギ葉(試料B)のメタノール抽出エキスと比べて、弱い活性しか示さなかった。(表2)

このことから、冬胞子形成誘導物質の生成には、コムギの生育段階のみではなく、コムギ赤さび病の感染の有無が強く関与していることが推測された。

また、その後の検討により、メタノール抽出後の罹病コムギ葉を、さらに蒸留水で抽出して得たエキスにも、メタノール抽出エキスと同様の冬胞子形成誘導活性を有することが明らかとなった。

以上の結果から、冬胞子形成誘導物質の抽出原料としては、冬胞子堆を多数形成した完熟期の感染コムギ葉が適当であり、冬胞子形成誘導物質はジクロロメタン等で脱脂した後に抽出したメタノールおよび水抽出エキス中に存在することが明らかとなった。

3. 冬胞子形成誘導物質の分離

3-1 冬胞子形成誘導物質の性状¹⁵⁾

前述の結果からわかるように、冬胞子形成誘導物質は、メタノールおよび水に可溶性物質である。種々の分離精製方法の検討過程において、冬胞子形成誘導物質は、①塩酸性で液液分配を行うと有機層に転溶する、②強弱両陽イオン交換樹脂には保持されないのに対し強弱両陰イオン交換樹脂には保持される、③浸透膜(R Membrane MWCO1000, Spectra/Pro[®])を通過するな

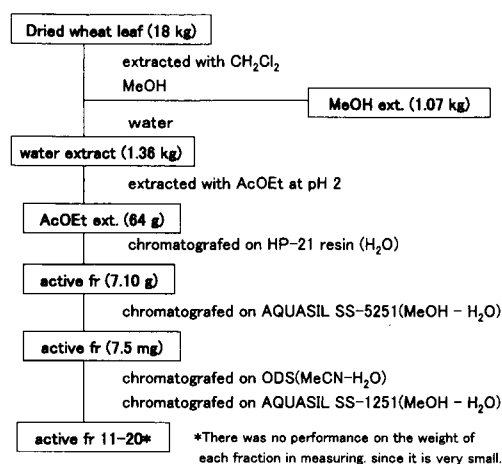


図5 罹病コムギ葉からの冬胞子形成誘導物質の分離操作図

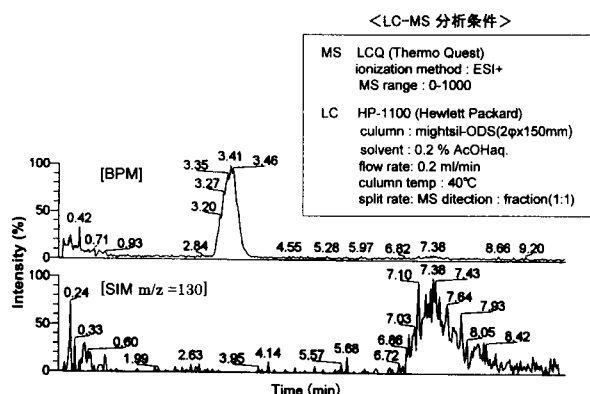


図6 活性画分 fr. 17 の LC-MS クロマトグラム

どの性状を示した。

これらの結果から、冬胞子形成誘導物質は酸性低分子化合物であると考えた。

3-2 分離操作¹⁵⁾

冬胞子堆を多数形成した乾燥コムギ葉 18 kg (1999 年採集) を切裁し、ジクロロメタンで脱脂した後、メタノールで 2 回、次に蒸留水で 2 回抽出を行ない、メタノール抽出エキス 1.07 kg および水抽出エキス 1.36 kg に得られた。それぞれのエキスには、冬胞子形成誘導活性が認められた。

本稿では、主に水抽出エキスの分離について記述する。水抽出エキスは 4M 塩酸で pH 2 に調製した後、酢酸エチルで 2 回抽出した。得られた有機層は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、減圧濃縮し抽出物 64 g を得た。抽出物は、150 ml の水に懸濁し、遠心分離 (3850 g, 20 min) 後、上清液を HP21 (DIAION 製) 樹脂カラム (樹脂量 2 L: カラム内径 75 mm) に負荷し、蒸留水 10 L で溶出し、1 L ずつ分画した。活性が認められた画分 (7.10 g) は、AQUASIL SS-5251 (20×250 mm: 95% MeOH→H₂O liner gradient) にて、繰り返し分離を行い、1 μg で冬胞子形成誘導活性を示す分画 (7.5 mg) を

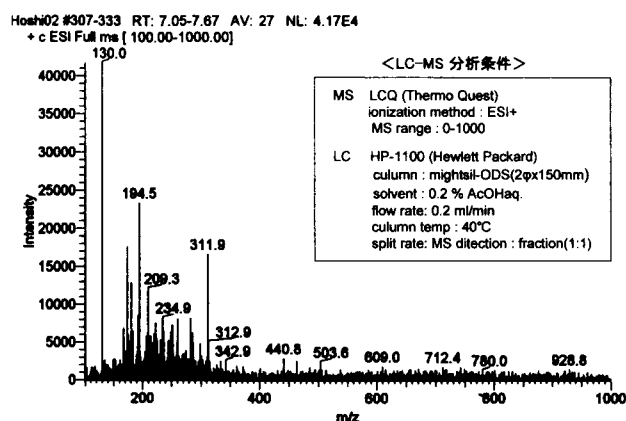


図7 活性画分 fr. 17 の MS クロマトグラム (Rt=7.05-7.67 min)

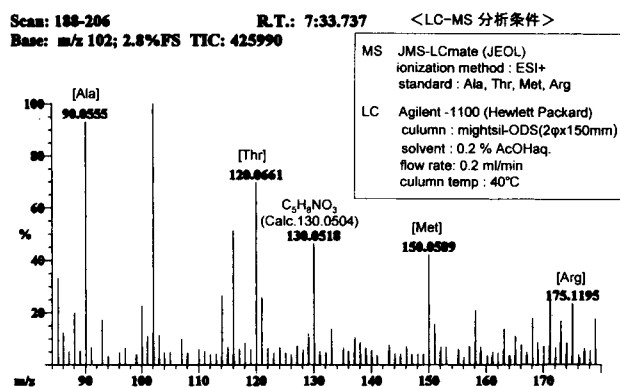


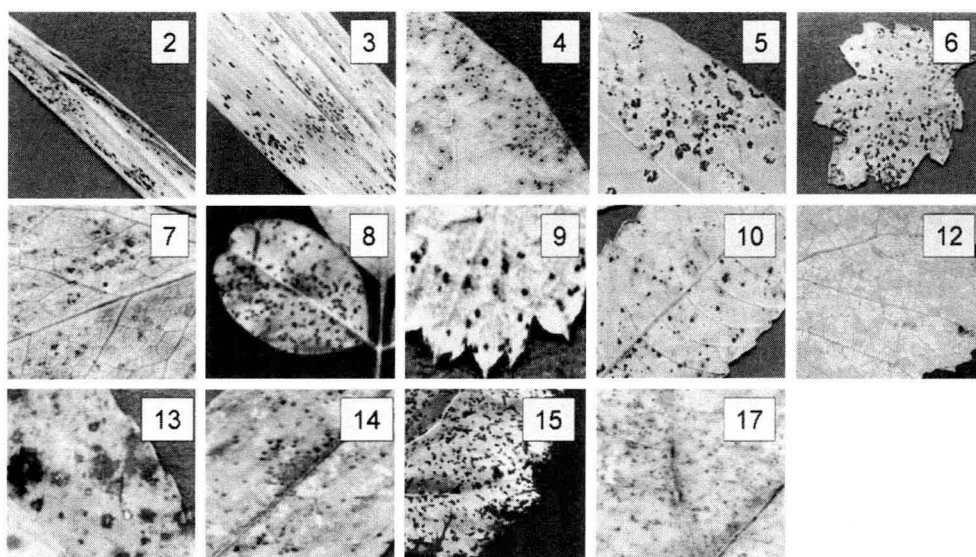
図8 精密質量測定における m/z 130 の正イオン ESI スペクトル

得た。

さらに ODS (4.6×150 mm: 95% MeCN→H₂O liner gradient) で分離した後、AQUASIL SS-1251 (4.6×250 mm: 95% MeOH→H₂O liner gradient, 1fr=1.0 ml) にて分離を行なったところ、冬胞子形成誘導活性は fr.11-20 に認められた (図5)。

3-3 LC-MS を用いた分離検討

3-2 で得られた活性画分 fr.11-20 の各々について、紫外分光光度計にて 210-400 nm 領域の測定を行なったが、UV 吸収は観測されなかった。各フラクション量も微量であることから、質量分析計 (MS) を検出器とした HPLC (LC-MS) による分離検討を行なうこととした。活性画分 fr.11-20 の各フラクションについて別記した分離条件で、LC-MS 測定を行い、BP (Base Peak) でモニタリングしたところ、全フラクションともに Rt=3.4 min 付近に強いピークを示したが、そこには冬胞子形成誘導活性はなく、冬胞子形成誘導活性は全フラクションともに Rt=6-8 min 付近に認められた。そこで、各フラクションに共通する分子イオンの有無について調査したところ、各フラクションには常に分子量 m/z 130 の偽分子イオンがイオン強度の大きいピークとして存在す



さび病菌(宿主植物) 2: *Puccinia miscanthi* Miura(ススキ)、3: *P. magnusiana* Koernicke(ヨシ)、
4: *P. polygoni-amphibii* Persoon var. *tovariae* Arthur(イタドリ)、5: *P. dieteliana* P. Sydow ex Dietel(オカトラノオ)
6: *P. tanacetii* de Candolle var. *tanacetii*(キク)、7: *P. tokyensis* P. et H. Sydow(ミツバ)
8: *Uromyces lespezdeae-procumbentis* (Schweinitz) Curtis var. *lespezdeae-procumbentis*(ハギ)
9: *Phragmidium pauciloculare* (Dietel) H. et P. Sydow(ナワシロイチゴ)
10: *Pileolaria klugkistiana* (Dietel) Dietel(スルデ)、12: *Coleosporium yamabense* (Saho) Hiratsuka, f.(フキ)
13: *Melampsora chelidonii-pierotii* Matsumoto(アカメヤナギ)、14: *M. epiphylla* Dietel(オノエヤナギ)、
15: *M. larici-populina* Klebahn(ポプラ)、17: *Phakopsora pachyrhizi* H. et P. Sydow(クズ)

図9 冬胞子堆が多く観察された各さび病菌感染植物の葉部

ることが明らかとなった。一例として図6に活性分画 fr.17 の BP クロマトグラムおよび分子量 m/z 130 の SIM (Single Ion Monitoring) クロマトグラムを示し、図7に fr.17 の $R_t=7.0$ min 付近の MS クロマトグラムを示した。

次に、分子イオン m/z 130 について情報を得るために、高分解能質量分析 (HRMS) 測定を行なった (図8)。Selected Isotopes: $H_{0.20}C_{0.10}N_{0.3}O_{0.8}S_{0.4}P_{0.4}$, Error Limit: 10 mmu の条件で組成演算を行なった結果、その条件を満たす組成式として $C_4H_8N_3O_2$ 、 $C_5H_8NO_3$ および $C_4H_9N_3P$ の3式が得られた。冬胞子形成誘導物質は、酸性物質の性状を示すことからカルボン酸基や水酸基等の官能基を有する可能性が大きいと推測し、 m/z 130 の分子式は $C_5H_8NO_3$ が妥当と考えた。ESI+では、分子イオンはプロトン付加イオンとして検出されることから、冬胞子形成誘導物質の分子式を $C_5H_7NO_3$ (分子量 129) と推定した。現在、構造確定に必要な量の確保を目指し、前述したメタノールエキスおよびその後採集した罹病コムギ葉からの冬胞子形成誘導物質の分離精製を行なっている段階である。

4. 他のさび菌類における冬胞子形成誘導物質について¹⁶⁾

本文の冒頭で触れたように、本研究の材料である罹病コムギ葉を収穫期に多量に採集することは容易ではなく、構造解析に必要な活性物質の確保は簡単ではない。

しかし、仮に冬胞子形成誘導物質がさび病菌感染植物に広く分布する物質であるとすれば、コムギ赤さび病菌以外のさび病菌感染植物内にも冬胞子形成誘導物質は存在するはずであり、本研究の材料確保が容易になる可能性があると考えた。そこで、冬胞子を多数形成した種々のさび病菌感染植物葉についてコムギ赤さび病菌に対する冬胞子形成誘導活性の有無を検討した。十数種のさび菌罹病植物 (図9) を集め、それぞれの抽出エキスについて冬胞子形成誘導活性を調べた結果、すべての罹病植物葉エキスに冬胞子形成誘導活性が認められた (表3)。このことから、冬胞子形成誘導物質は基本的にさび病菌感染植物内に共通して存在する物質であると考えられる。種々のさび菌類の冬胞子形成誘導因子の共通性・変異度については、今後更に検討を加える予定である。

ま と め

さび病菌を接種したコムギ子葉を用いた冬胞子形成誘導活性試験法によりコムギ赤さび病菌に感染した収穫期直後のコムギ葉に最も強い冬胞子形成誘導活性が現れることを確認した。この時期に採集した罹病コムギ葉のメタノール抽出エキス及び水抽出エキスを HP21, CPC, HPLC 等の分離手法を用いて、冬胞子形成誘導物質の分離・精製を行っており、現在一番強い活性画分は数ナノグラム程度で活性を示すまでに濃縮されている。本分画の冬胞子誘導活性は極めて強いが、罹病植物葉に対する含量は極めて微量であることから、冬胞子形成誘導物質

表3 罹病植物エキスのコムギ赤さび病菌に対する冬胞子形成誘導活性の有無について

科 名	共試さび菌 種 名	採集時の宿主植物	冬胞子誘導活性試験結果	
			メタノールエキス	水エキス
Pucciniaceae	<i>Puccinia recondita</i>	コムギ	○	○
	<i>P. miscanthi</i>	ススキ	○	○
	<i>P. magnusiana</i>	ヨシ	○	○
	<i>P. polygoni-amphibii</i>	イタドリ	○	○
	<i>P. dieteliana</i>	オカトラノオ	○	×カレ
	<i>P. tanacetii</i>	キク	○	○
	<i>P. tokyensis</i>	ミツバ	○	○
	<i>Uromyces lespedezae-procumbentis</i>	ヤマハギ	○	○
Phragmidiaceae	<i>Phragmidium pauciloculare</i>	ナワシロイチゴ	○	○
Pileolariaceae	<i>Pileolaria klugkistiana</i>	ヌルデ	○	○
Coleosporiaceae	<i>Coleosporium yamabense</i>	フキ	○	○
	<i>C. asterum</i>	ゴマナ	×	○
Melampsoraceae	<i>Melampsora chelidonii-pierotii</i>	アカメヤナギ	×	○
	<i>M. epiphylla</i>	オノエヤナギ	○	○
	<i>M. abietis-populi</i>	ポプラ	×	○
	<i>M. larici-populina</i>	ポプラ	○	○
	<i>M. populnea</i>	ヤマナラシ	○	○
Phakopsoraceae	<i>Phakopsora pachyrhizi</i>	クズ	○	○

○冬胞子形成誘導活性あり、×冬胞子形成誘導活性なし、カレ 葉の枯れが著しいもの。

の構造解明の第一段階として LC-MS を用いることとした。その結果、活性分画には常に m/z 130 の偽分子イオンピークが存在することが明らかとなり、さらに HRMS の測定結果から冬胞子形成誘導物質の分子式を $C_5H_7NO_3$ と推定した。現段階では未だ冬胞子形成誘導物質の構造確定には至っていないが、精製の過程で活性物質が低分子量の酸性物質であると推定されていたので、入手可能な種々のアミノ酸やカルボン酸類を活性試験に付したところ、L-proline に弱い活性が認められた。これらの結果から、冬胞子形成誘導物質は、現在のところアミノ酸あるいはカルボン酸の関連化合物ではないかと推測している。さらに、コムギ赤さび病菌に罹病したコムギ葉を収穫期に多量に採集することが容易ではないことから、冬胞子形成誘導物質の量確保を目的として *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* 以外のさび菌に罹病した種々の植物エキスのコムギ赤さび病菌に対する冬胞子形成誘導活性の有無について検討を行った。十数種のさび菌罹病植物を集め、各感染葉エキスの活性を調べた結果、すべての罹病植物に冬胞子形成誘導活性が認められた。種々のさび菌の冬胞子形成誘導因子の共通性・変異

度について今後検討を加える予定であるが、冬胞子形成誘導物質は基本的にさび病菌に共通のものであると考えている。本研究は、直接的にはコムギ赤さび病に対する化学防除を目的としているが、本課題の成果により広くさび病菌全般の冬胞子形成誘導物質の解明につながるものと期待している。

謝 辞

本研究に対し平成 13 年度星薬科大学大谷記念研究助成金を拝領いたしましたことに厚く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり終始ご指導をいただきました薬化学教室河合賢一教授および野沢幸平助教授に心より感謝いたします。また、コムギ赤さび病菌の供与ならびに多くのさび菌感染植物の採集にご尽力賜りました筑波大学農林学系山岡裕一助教授、さらに高分解能質量分析を測定していただいた日本電子株式会社第 2 応用研究センターの田中和子先生に御礼申し上げます。最後に、本研究にご協力いただいた薬化学教室大学院生および卒業生に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Magnus, P. 1891. Ueber das Auftreten der Stylosporen bei den Uredineen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **9**: 85-92.
- 2) Gassner, G. 1915. Die Teleutosporenbildung der Getreiderostpilze und ihre Bedingungen. Ztschr. Bot. **7**: 65-120.
- 3) Parker, J. H. 1918. Greenhouse experiments on the rust resistance of oat varieties. U. S. Dept. of Agriculture Bul. P. 629.
- 4) Waters, C. W. 1928. The control of teliospore and urediniospore formation by experimental methods. Phytopathology **18**: 157-213.
- 5) Peturson, B. 1930. Effect of temperature on host reactions to physiologic forms of *Puccinia coronata avenae*. Scientific Agriculture **11**: 104-111.
- 6) Simons, M. D. 1954. The relationship of temperature and stage of growth to the crown rust reaction of certain varieties of oats. Phytopathology **44**: 221-223.
- 7) Zimmer, D. E. and Schafer, J. F. 1961. Variability of telial formation of *Puccinia coronata*. Indiana Academy of Science **70**: 91-95.
- 8) 高橋幸吉, 山田昌雄, 高橋広治, 1965. コムギ幼苗上における赤さび病菌の冬胞子形成菌株と品種との相互関係ならびに冬胞子の諸性質. 日本植物病理学会報 **30**(1): 54-60.
- 9) Jackson, A. O. and Young, H. C. Jr. 1967. Teliospore Formation by *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on Seeding Wheat Plants. Phytopath. **57**: 793-794.
- 10) Mirocha, C. J. and Zaki, A. I. 1966. Fluctuation in amount of starch in host plants invaded by rusts and mildew fungi. Phytopathology **56**: 1220-1224.
- 11) Yeh, C. C., Tschanz, A. T., and Sinclair, J. B. 1981. Induction of teliospore formation by *Phakospora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. Phytopathology **71**: 1111-1112.
- 12) Volker, K. and Boyle, C. 1994. Bean rust as a model system to evaluate efficiency of teliospore induction, especially in the potential mycoherbicide *Puccinia punctifotmis*. Weed Research **34**: 275-281.
- 13) Wagner, S. and Boyle, C. 1995. Changes in carbohydrate, protein and chlorophyll content, and enzyme activity during the switch from uredinio-to teliospore sporulation in the bean-rust fungus *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Link. Journal of Phytopathology **143**: 633-638.
- 14) Hosoe, T., Sano, T., Nishikawa, H., Nozawa, K., Kawai, K., Yamaoka Y., Katsuya, K., Sato, T., Hagiwara, H. and Saito, H. 2001. A substance inducing teliospore production in wheat leaf rust, *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Mycoscience **42**: 241-245.
- 15) 細江智夫, 野沢幸平, 河合賢一, 山岡裕一, 2000. さび病菌の冬胞子形成誘導物質の解明. 未解明生物現象を司る鍵化学物質「第一回公開シンポジウム」ポスター発表.
- 16) 細江智夫, 野沢幸平, 河合賢一, 山岡裕一, 柿島 眞, 2001. コムギ赤さび病菌の冬胞子形成誘導物質の研究 III. 日本菌学会第 45 回大会講演要旨集 p 56.